

外源钙对盐胁迫下豌豆幼苗生化指标的影响

刘新星, 罗俊杰

(甘肃省农业科学院 生物技术研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘要:以“陇豌1号”豌豆为试材,以蛭石与砂砾(1:1混合)为栽培基质,研究了浸种和根施 CaCl_2 2种方式对盐胁迫(NaCl 171 mmol/L)下两叶一心期幼苗超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)活性、丙二醛(MDA)、脯氨酸和可溶性糖含量的影响。结果表明:2种施钙处理下,适宜浓度的 CaCl_2 能显著增加豌豆幼苗SOD和POD保护酶活性,提高渗透调节物质脯氨酸和可溶性糖含量,降低丙二醛含量。综合各项指标,根施处理对盐胁迫的缓解效果较浸种好,其中14 mmol/L CaCl_2 根施处理效果最佳,浸种处理只对短期胁迫内幼苗抵御盐害的能力有一定提高。

关键词:钙; 盐胁迫; 渗透调节

中图分类号:S 643.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001—0009(2013)14—0024—04

盐碱土又称盐渍土壤,是盐土、盐化土以及碱土、碱化土壤的总称。盐碱土以土壤溶液含 Na^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 及 CO_3^{2-} 、 HCO_3^- 、 Cl^- 和 SO_4^{2-} 浓度高为主要特征,尤其是 Na^+ 和 Cl^- 含量高^[1]。盐分胁迫对植物的伤害,在很大程度上是通过破坏质膜完整性的钙信号系统的正常发生和传递而完成的^[2]。因而盐分胁迫条件下施加适量的外源钙,一方面可以缓解因钙不足造成的矿质营养胁迫,另一方面适量的钙能够增加质膜的稳定性和钙平衡^[3]。汪良驹等^[4]研究表明,无花果细胞中游离脯氨酸含量随盐胁迫强度的增加而增加,且对钙浓度的依赖性也越强;黄广远等^[5]在高羊茅草上的研究表明,施加适宜浓度的外源钙能显著提高盐胁迫下叶片的叶绿素含量;张士功等^[6]用硝酸钙溶液处理小麦幼苗,发现能够明显提高叶片的含水量,减轻盐分胁迫导致的水分亏缺和由此带来的次生伤害。施钙能提高SOD、POD等细胞保护酶的活性,减少活性氧物质的含量,从而降低植物细胞内活性氧自由基对质膜和膜脂过氧化作用水平的伤害,维持细胞膜的稳定性和完整性^[6~9]。盐胁迫下,植物体内MDA含量随着胁迫程度加重而明显增加。施钙能抑制膜脂在盐胁迫下植物MDA的积累^[10],说明钙能抑制膜脂过氧化作用,从而减轻膜脂过氧化对细胞的伤害。

近年来,由于灌溉及大棚等设施问题,引发土壤次

生盐渍化现象严重,而豌豆是喜钙作物,可以直接吸收石灰粉,因此研究外源钙是否能提高豌豆的抗盐性对提高豌豆产量及扩大种植面积具有深远意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试“陇豌1号”豌豆由甘肃省农业科学院作物研究所提供。配制盐溶液所用 NaCl 、 CaCl_2 为分析纯,盆栽基质为洗净烘干后的砂子与蛭石等体积的混合物。

1.2 试验方法

试验共设7个处理(表1),选取籽粒饱满,大小均一的豌豆,对照和T处理组用自来水浸种,S处理组分别用5、14、23 mmol/L的 CaCl_2 溶液浸种。浸泡种子12 h后放入培养皿内在25℃恒温箱内进行催芽,待芽长出1~2 cm时,选取发芽一致的种子播种于13 cm×15 cm的营养钵内。将各处理放入温室内培养,每天上下左右调换营养钵的位置,保证各处理间光照均匀,排除边际效应。待幼苗长至两叶一心时,用各处理液进行浇灌,浇灌量为营养钵持水量的2倍,每隔2 d浇灌1次。于处理后第6日开始测定,每隔5 d取植株自下向上第3~5叶进行测定,共测定4次。每处理3次重复,每重复种植5钵,每钵播种籽粒10颗。

1.3 项目测定

丙二醛含量采用TBA显色法测定^[11];可溶性糖含量采用蒽酮比色法测定^[12];脯氨酸含量采用茚三酮显色法测定^[13];超氧化物歧化酶活性采用氮蓝四唑法测定^[11];过氧化物歧化酶活性采用愈创木酚法测定^[11]。酶液的提取:称取新鲜材料0.5 g置研钵中,加2 mL预冷0.05 mol/L pH 7.8磷酸缓冲液在冰浴上研磨成浆,用缓冲液冲洗研钵,使终体积为5 mL,在4℃ 5 000 r/min下

第一作者简介:刘新星(1986-),女,硕士,研究方向为作物遗传育种。E-mail:lxz19860621@163.com。

责任作者:罗俊杰(1962-),男,博士,研究员,硕士生导师,研究方向为生物技术。E-mail:hnsljjie@163.com。

基金项目:甘肃省农科院农业科技创新专项资助项目(2012GAAS15-6)。

收稿日期:2013-04-15

表 1 NaCl 和 CaCl₂ 处理组合Table 1 Composition treatment of NaCl and CaCl₂

处理 Treatment	成分组成 Composition
CK	171 mmol/L NaCl+营养液
T1	171 mmol/L NaCl+5 mmol/L CaCl ₂ (根施)+营养液
T2	171 mmol/L NaCl+14 mmol/L CaCl ₂ (根施)+营养液
T3	171 mmol/L NaCl+23 mmol/L CaCl ₂ (根施)+营养液
S1	171 mmol/L NaCl+5 mmol/L CaCl ₂ (浸种)+营养液
S2	171 mmol/L NaCl+14 mmol/L CaCl ₂ (浸种)+营养液
S3	171 mmol/L NaCl+23 mmol/L CaCl ₂ (浸种)+营养液

离心 20 min, 上清液即为粗酶液。

1.4 数据分析

试验数据采用 DPS 软件分析, 进行 LSD 测验。

2 结果与分析

2.1 不同 CaCl₂ 施加方式对盐胁迫下豌豆幼苗叶片渗透调节物质的影响

2.1.1 对脯氨酸(Pro)含量的影响 由表 2 可知, 随处理时间的延长, 对照及各处理豌豆幼苗叶片脯氨酸含量呈总体上升趋势, 加钙处理显著高于对照。5 d 时, T2 的 Pro 含量最高, S1 的最低, T1、T3、S2 和 S3 处理间差异不显著; 15 d 时, T1 与 S1 处理差异不显著, S2 和 S3 的 Pro 含量高于 T1 和 T3 处理; 20 d 时, 对照及各处理

的 Pro 含量均低于 15 d, 表明幼苗在长期胁迫下由应激产生大量的渗透调节物质来抵御盐胁迫后期抗盐能力逐渐下降的过程。整个处理过程中, T2 的 Pro 含量一直保持最高水平。处理前期 S3 高于 T1、T3 处理, 后期则低于 T1 处理, 表明钙浸种在短期盐胁迫内能迅速积累脯氨酸, 起到良好的缓解作用, 但在长期胁迫下其缓解效果较根施差。

2.1.2 对可溶性糖含量的影响 由表 2 可知, 对照及处理的豌豆幼苗叶片可溶性糖含量随处理时间的延长总体呈上升趋势, 加钙处理显著高于对照。5 d 时, S3 处理含量最高, 且 S 处理组平均值高于 T 处理组; 10 d 时, 除 T2 极显著高于对照及其它处理外, T1、T3 和 S 各处理组间差异不显著; 15 d 时, 除对照外, 其它各处理与 10 d 相比增大幅度不大, 处理间差异与 10 d 趋势相同; 20 d 时, 对照与 15 d 相比显著下降, 其余各处理有所下降, 但差异不显著, 表明加钙处理虽然在胁迫后期的缓解效果有所减弱, 但仍然可积累较多的可溶性糖, 提高了幼苗的抗盐能力。在整个处理过程中, 5 d 时 S3 处理的可溶性糖含量最高, 10~20 d T2 最高, S 处理组间差异不显著, 处理后期 S 处理组与 T3 处理差异不显著。

表 2 CaCl₂ 对豌豆幼苗叶片脯氨酸和可溶性糖含量的影响Table 2 Effect of CaCl₂ on proline content and soluble sugar content in pea seedlings

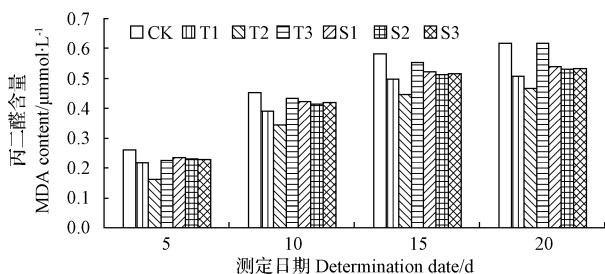
处理 Treatment	脯氨酸含量 Protein content/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$				可溶性糖含量 Soluble sugar content/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$			
	5 d	10 d	15 d	20 d	5 d	10 d	15 d	20 d
CK	258.011eD	356.631dC	435.115dD	406.782dD	6.598eC	8.440cC	11.087dC	9.610dD
T1	357.962bcdBC	467.171bAB	507.093bB	444.593bcB	8.155bcBC	12.535bB	13.312bcB	13.424bAB
T2	425.511aA	515.781aA	562.344aA	494.026aA	10.825aAB	15.009aA	16.977aA	15.226aA
T3	379.988bB	428.988bcB	464.089cCD	409.922dCD	9.602abAB	12.527bB	12.178bcdBC	11.745cBC
S1	336.134dC	422.012cB	502.189bBC	432.292cBC	10.092aAB	12.155bB	12.064cdBC	11.364cCD
S2	353.117cdBC	452.772bcB	525.620bAB	452.226bB	10.981aA	12.716bB	13.291bcB	12.391bcBC
S3	365.810bcBC	452.924bcB	530.261bAB	451.311bB	11.479bA	13.524abAB	13.674bB	11.624cBC

注: 不同大小写字母分别表示达 0.01 和 0.05 水平显著差异。下同。

Note: Different capital letters, small letters indicated significant difference at 0.01 and 0.05 levels, respectively. The same as below.

2.2 不同 CaCl₂ 施加方式对盐胁迫下豌豆幼苗活性氧代谢的影响

2.2.1 对丙二醛含量的影响 由图 1 可知, 对照及各处理组豌豆幼苗叶片丙二醛含量均随胁迫时间的延长显

图 1 CaCl₂ 对豌豆幼苗叶片丙二醛含量的影响Fig. 1 Effect of CaCl₂ on MDA content in pea seedlings

著升高。盐胁迫处理的 MDA 含量最高, 加钙处理后明显降低, 且 T2 处理的 MDA 含量一直维持较低水平并达到最小值。5 d 时, T2 比对照低 37.73%, T1、T3、S1、S2 和 S3 各处理间差异不显著, 但相比对照分别低 16.93%、13.75%、10.57%、11.33% 和 14.50%, 与对照差异极显著; 10 d 时, T3 处理高于 T1 和 S 处理组, 但仍低于对照; 15~20 d, T3 处理的 MDA 含量逐渐升至与对照无显著差异。在整个处理过程中, S2 和 S3 差异不显著, 且显著低于 S1。T 处理组中 T2 处理的 MDA 含量最低, T1 次之, T3 在处理后期与对照差异不显著, 表明 Ca^{2+} 浓度与盐胁迫的缓解程度并不呈正相关关系。这与杨晓玲等^[14]在番茄上的研究结果一致, 钙浓度较低时主要起缓解 NaCl 胁迫的作用, 随着钙浓度的提高, 钙本身也会带来盐胁迫, 使其对 NaCl 胁迫的缓解作用被

削弱。

2.2.2 对 SOD 活性的影响 由表 3 可知,加钙处理后豌豆幼苗的 SOD 活性比单盐处理增大,且随着处理时间的延长,对照及各处理总体呈上升趋势。其中,处理 5 d 时,各处理均高于对照,且差异极显著;10 d 时,T2 处理的 SOD 活性最高,S3 最低,T3 和 S1、S2 间差异不显著;15 d 时,T1 和 T2 间差异不显著,T3 的 SOD 活性最低;20 d 时,对照及各处理的 SOD 活性有所下降,T3 低于对照 10.86%,S3 与对照无显著差异,其它各处理仍高于对照。整个处理过程中,T2 的 SOD 活性一直维持最高,T3 在处理末期低于对照。S2 在处理后期显著高于

表 3 CaCl_2 对豌豆幼苗叶片超氧化物歧化酶和过氧化物歧化酶活性的影响

Table 3

Effect of CaCl_2 on SOD and POD activity in pea seedlings

处理 Treatment	超氧化物歧化酶活性 SOD activity/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$				过氧化物酶活性 POD activity/ $\text{U} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$			
	5 d	10 d	15 d	20 d	5 d	10 d	15 d	20 d
CK	93. 553dD	134. 453deD	169. 350eBC	142. 277dD	88. 710cC	123. 560eD	162. 587cdC	129. 637deDE
T1	122. 283abA	177. 387bB	216. 960abAB	185. 677bB	122. 533bB	151. 273cdBC	194. 333bB	170. 733bB
T2	129. 780aA	203. 387aA	241. 097aA	225. 297aA	164. 467aA	190. 090aA	231. 013aA	217. 003aA
T3	100. 313cdCD	141. 593cdeCD	163. 430cC	128. 497eE	129. 507bB	149. 830cdBC	155. 193dC	121. 527eE
S1	105. 800cCD	145. 143cdCD	188. 027bcBC	144. 320dD	122. 000bB	145. 203dC	181. 830bcBC	144. 310cdCD
S2	118. 780bAB	150. 320cC	216. 987abAB	165. 020cC	132. 133bB	163. 393bB	180. 723bcBc	154. 790cBC
S3	108. 240cBC	132. 123eD	180. 443cBC	143. 427dD	134. 713bB	157. 730bcBC	170. 303cdBC	120. 413eE

3 结论与讨论

渗透调节是植物提高耐盐性的一个重要途径,脯氨酸和可溶性糖是植物体内重要的渗透调节物质。植物体通过增加渗透调节物质来平衡渗透势,以减轻盐害^[15]。该研究中,豌豆幼苗叶片脯氨酸和可溶性糖含量随处理时间的延长显著增加,且加钙处理明显高于对照。其中以 14 mmol/L CaCl_2 溶液根施处理的 2 种指标含量一直保持最高,2 种施钙方式下根施处理的脯氨酸含量平均高于浸种处理。处理后期,23 mmol/L CaCl_2 溶液根施处理的脯氨酸含量下降,降至与对照无显著差异,浸种处理中经 14 和 23 mmol/L CaCl_2 溶液浸种的豌豆幼苗脯氨酸含量较高。汪良驹等^[16]对无花果愈伤组织的研究表明,培养基中添加一定量 CaCl_2 不仅在一定程度上缓解盐分对生长的抑制作用,而且明显促进游离脯氨酸积累。李青云等^[17]研究表明, Ca^{2+} 能有效提高草莓对盐胁迫的渗透调节能力。该试验结果表明,施钙能明显提高作物的渗透调节物质,但钙离子浓度与渗透调节物质含量并不是正相关关系。盐胁迫会破坏植物的细胞膜,减少作物正常生长所需的钙离子,因此补充适当的钙离子可以减缓盐害,帮助作物抵御伤害,但过量的 Ca^{2+} 则会和 Cl^- 、 Na^+ 一起对植株造成离子胁迫。短期胁迫下,浸种处理的渗透调节物质积聚迅速,含量高于浇灌处理,但对于长期胁迫,根施处理的渗透调节物质一直保持较高水平,能更好的抵御盐害。

研究表明,钙信号对活性氧信号也具有重要的调控

S1、S3、S1 和 S3 处理间差异不显著。

2.2.3 对 POD 活性的影响 由表 3 看出,豌豆幼苗叶片 POD 活性随处理时间的延长,对照及各处理呈上升趋势,加钙处理明显高于对照。5 d 时,各处理极显著高于对照,其中 T2 的 POD 活性最高;10 d 时,T 处理组除 T2 处理外,其余处理间差异不显著,S2 的 POD 活性最高,但仍显著低于 T2 处理;15 d 时,T3 处理 POD 活性低于对照;20 d 时,对照及各处理 POD 活性均有所下降。整个处理过程中,T 处理组 T2 的 POD 活性保持最高,S 处理组中 S2 最大,T 处理组的 POD 活性平均高于 S 处理组,T3 和 S3 在处理末期都低于对照。

作用。 Ca^{2+} 可直接激活 NADPH 氧化酶,诱导活性氧的产生^[18]。逆境植物在正常条件下 SOD 含量一般较低,当遭到盐胁迫时,植物因代谢失调而积累活性氧引起自由基伤害,SOD 活性升高,抗逆能力增强,但盐浓度过高可产生离子毒害,从而降低 SOD 活性,其酶活性可通过加 Ca^{2+} 来恢复^[19]。该研究中,2 种施钙方式下,根施处理组中 14 mmol/L CaCl_2 处理的 SOD 和 POD 活性最高,浸种组中 14 mmol/L CaCl_2 溶液浸种的豌豆幼苗 SOD 活性最高,5~14 mmol/L 浸种的 POD 活性较高,但仍低于 5 mmol/L CaCl_2 溶液根施处理。23 mmol/L CaCl_2 浇灌处理的 SOD 和 POD 活性最低,至处理末期与对照无显著差异。随处理时间的延长,对照及各处理的 2 种酶活性在 20 d 时有所下降,这是逆境下植物正常氧代谢受到干扰,一方面促进了活性氧的产生,另一方面又破坏了以 SOD 为主导的细胞膜保护系统。在这种双重作用下,植物加速膜脂过氧化链式反应,增加过氧化有害产物积累,导致细胞膜系统破坏及大分子生命物质的损伤,最后导致植物死亡^[20]。从研究结果得出,根施处理对豌豆幼苗保护酶活性的增加优于浸种,不论是哪种施钙方式,适宜浓度的 CaCl_2 溶液对盐胁迫有良好的缓解作用,但浓度过大反而会造成更深的伤害。

MDA 是膜脂过氧化产物,是反映活性氧代谢的一个重要指标。该试验结果表明,加钙能极显著降低豌豆幼苗的 MDA 含量,减少盐胁迫对膜脂的伤害,维持细胞膜的稳定性。2 种加钙方式下,根施组的 MDA 含量平均低于浸种组,其中 14 mmol/L CaCl_2 根施处理的 MDA

含量一直保持最低,23 mmol/L CaCl_2 根施处理的 MDA 含量在 10~20 d 时反而高出对照,表明 Ca^{2+} 只在一定浓度范围内起保护质膜的作用,超过最适浓度,对植物会形成新的盐害。

钙浸种能提高胁迫种子的萌发率,缓解盐胁迫对幼苗的伤害,这对于农业生产具有非常重大的意义。郭丽红等^[21]在氯化钙浸种对玉米幼苗抗逆性的影响研究中指出,由于预先用 CaCl_2 浸种, Ca^{2+} 进入细胞间隙会大大提高了种子胞外 Ca^{2+} 含量,为逆境胁迫下抵抗膜伤害做准备。当种子萌发后,因活细胞内外巨大的电化学梯度, Ca^{2+} 被动扩散入细胞,同时利用代谢活动加强后提供的充足能量主动进入。因此一旦胁迫信号被感知,引发整个与 Ca^{2+} -CaM 相偶联的生理生化机制,使细胞及早启动逆境适应机制,尽量避免或减轻伤害。吕桂云等^[22]在钙浸种西葫芦种子耐盐性的试验中得出结果,适宜浓度的 Ca^{2+} 对盐胁迫下种子的发芽有明显的缓解作用。根施目前仅限于室内研究,虽然此方式对盐胁迫的缓解效果优于浸种处理,但对于大田种植其实用性及经济意义远不如浸种。该研究仅是在抗性生理研究中的初步尝试,且仅探索单一方式对盐胁迫的缓解作用,对于大田实践,综合各种缓解措施选出最优的施钙方式还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 赵可夫.植物抗盐生理[M].北京:中国科学出版社,1993.
- [2] 陈全战,张边江,周峰,等.渗盐分、水分胁迫对番茄幼苗生理指标的影响[J].湖北农业科学,2008,47(5):525-527.
- [3] 戴高兴,彭克勤,皮灿辉.钙对植物耐盐性的影响[J].中国农学通报,2003,19(3):79-101.
- [4] 汪良驹,刘友良,马凯.钙在无花果细胞盐诱导脯氨酸积累中的作用[J].植物生理学报,1999,25(1):38-42.
- [5] 黄广远,祁芳梅,陈隐君.钙对盐胁迫下高羊茅部分生理指标影响的初步研究[J].长江大学学报(自然科学版),2008,5(3):21-23.
- [6] 张士功,高吉寅,宋景芝,等.硝酸钙对小麦幼苗生长过程中盐害的缓解作用[J].麦类作物,1998,18(5):60-64.
- [7] 袁清昌,许长成,邹琦.钙信使系统在百草枯诱导小麦幼苗膜脂过氧化中的作用[J].植物生理学通讯,1996,32(1):13-16.
- [8] 任红旭,陈雄.抗旱性不同的小麦幼苗在水分和盐胁迫下抗氧化酶和多胺的变化[J].植物生态学报,2001,25(6):709-715.
- [9] 张芬琴,沈振国,刘友良.钼和钼十钙对小麦根尖质膜、液泡膜微囊 ATP 酶和膜流动性的影响[J].植物生理学报,2000,26(2):105-110.
- [10] 刘峰,张军,张文吉.氧化钙对水稻的生理作用研究[J].植物学通报,2001,18(4):490-495.
- [11] 郝再彬,苍晶,徐仲.植物生理实验[M].哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2004:31-110.
- [12] 张殿忠,汪沛洪,赵会贤.测定小麦叶片游离脯氨酸的方法[J].植物生理学通讯,1990,26(4):62-65.
- [13] 林炎坤.常用的几种蒽酮比色定糖法的比较和测定[J].植物生理学通讯,1989,25(4):53-55.
- [14] 杨晓玲,郭金耀.硝酸钙对番茄氯化钠胁迫下的缓解效应[J].北方园艺,2010(3):15-18.
- [15] Tester M, Davenport R. Na^+ tolerance and Na^+ transport in higher plants[J]. Annals of Botany, 2003, 91: 503-527.
- [16] 汪良驹,刘友良,马凯.钙在无花果细胞盐诱导脯氨酸积累中的作用[J].植物生理学报,1999,25(1):38-42.
- [17] 李青云,葛会波,胡淑明.盐胁迫下外源钙对草莓内源激素含量的影响[J].西北植物学报,2008,28(3):517-522.
- [18] 王海波,黄雪梅,张昭其,等.植物逆境胁迫中活性氧和钙信号的关系[J].北方园艺,2010(22):189-194.
- [19] 杨素欣.盐胁迫下小麦的愈伤组织生理生化特性的变化[J].西北农业大学学报,1999,27(2):49-52.
- [20] 董彩霞,周健民,赵世杰.外源钙对不同钙敏感型番茄幼苗生理特性的影响[J].应用生态学报,2005,16(2):267-272.
- [21] 郭丽红,陈善娜,龚明.氯化钙浸种对玉米幼苗抗逆性的影响及其与谷胱甘肽还原酶的关系[J].云南植物研究,2004,26(1):111-117.
- [22] 吕桂云,高洪波,王梅,等.钙对 NaCl 胁迫下西葫芦种子发芽特性的影响[J].种子,2007,26(2):83-86.

Effects of Exogenous Calcium on Physiological Indexes of Pea Seedlings Under Salt Stress

LIU Xin-xing, LUO Jun-jie

(Institute of Biotechnology, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070)

Abstract: Taking ‘Longwan No. 1’ pea as test material, with mixed vermiculite and sand (1V : 1V) to cultured pea seedlings in the period of two leaves of one. Used seeds soaking and roots watering ways to regulate salt stress of NaCl (171 mmol/L), the contrast was nutrient solution with 171 mmol/L NaCl , the effect of calcium on activities of SOD and POD content of MDA, Pro and soluble sugar under salt stress were studied. The results showed that calcium treatment could significantly increase activities of SOD and POD in pea seedlings, and improve osmoregulation substances proline and soluble sugar content, decrease MDA content. Combined of various indicators, roots watering was more effective against salt stress than seeds soaking, and the optimal concentration of calcium was at 14 mmol/L. The seeds soaking only could promote the ability against salt stress in short times.

Key words: calcium; salt stress; osmoregulation